



DE00/01854

4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 27 039.2
Anmeldetag: 04. Juni 1999
Anmelder/Inhaber: Dr. Florian K e r n,
Berlin/DE
Bezeichnung: Peptide zur Vakzinierung gegen eine
Infektion mit HCMV
IPC: C 07 K, A 61 K

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.**

München, den 13. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hiebinger

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Peptide zur Vakzinierung gegen eine Infektion mit HCMV

Die Erfindung betrifft Peptide oder Peptidderivate, die zur Vakzinierung gegen die Infektion mit dem humanen Cytomegalovirus oder zur Diagnostik bei Patienten, welche eine Immunantwort gegen HCMV aufbauen können, geeignet sind.

Die humanen Cytomegalieviren (HCMV) bilden eine Gruppe artverwandter Viren, die zu den Herpes Viren zählen. (Lutz SCHNEIDER (1990) Pharmazie, Vol. 135 Nr. 27, 2396 - 2400) Nach einer Erstinfektion verbleiben die Viren latent im Körper. Erst wenn das Immunsystem durch eine medikamentöse oder durch Krankheit bedingte Immunsuppression geschwächt wird, werden die Viren reaktiviert. Den Namen erhielten die Viren, weil sie histopatologisch nachweisbare Riesenzellen mit randständigem großem Kern und Viren als Einschlußkörper verursachen. Die Viren sind ubiquitär. Die Durchseuchung der Population schwankt von 30% bis 85, ja 95%. Die zellvermittelte Immunantwort spielt bei der Kontrolle und der Abwehr gegen die HCMV - Infektion eine wesentliche Rolle. Wurden HCMV spezifische CD8⁺ T Zellen von einem Spender auf einen Patienten, der an HCMV leidet, übertragen, so konnte eine Immunantwort gegen die HCMV - Infektion beobachtet werden. (P.D. GREENBERG et al. (1991) Development of a treatment regimen for human cytomegalovirus (CMV) infection in bone marrow transplantation recipients by adoptive transfer of donor - driven CMV - specific T cell clones expanded in vitro. ANN. N. Y. Acad. Sci., Vol.: 636, pp 184 - 195)

Unglücklicherweise ist zur Zeit wenig über CD8⁺ T Zell - Epitope, die spezifisch das pp65 oder das IE-1 Protein erkennen, bekannt. Es wird angenommen, daß die Immunantwort wesentlich durch das IE-1 Protein und pp65 hervorgerufen wird. (N.J. ALP et al. (1991) Fine specificity of cellular immune responses in humans to human cytomegalovirus immediate - early 1 protein, J. Virol., Vol: 65, pp 4812 - 4820 und E.H. McLAUGHLIN - TAYLOR et al. (1994) Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8⁺ virus - specific cytotoxic T lymphocytes, J. Med. Virol., Vol.: 43, pp 103 - 110)

Die Infektion verläuft bei Erwachsenen mit einem funktionstüchtigen Immunsystem unauffällig und zeigt höchstens unspezifische Symptome, wie Abgeschlagenheit und leicht erhöhte Körpertemperatur. Bei immungeschwächten Erwachsenen stehen bei HCMV - Infektionen pulmonale Erkrankungen, Adernetzhaut-Entzündungen und Magen-Darm-Erkrankungen im Vordergrund. Bei AIDS-Patienten verursachen CMV-Infektionen die meisten Todesfälle.

Verschiede Substanzen werden zur Behandlungen gegen das Cytomegalievirus eingesetzt.

Foscarnet ist eine antivirale Substanz mit in Zellkulturen nachgewiesener selektiver Aktivität gegen Humanviren der Herpes-Gruppe, wie zum Beispiel Herpes simples, Varicella zoster, Epstein-Barr und Cytomegalie-Viren, sowie Hepatitis Viren. Die antivirale Wirkung beruht auf einer Hemmung viraler Enzyme, wie DNA-Polymerasen und reversen Transkriptasen. Auf Cytomegalieviren wirkt Foscarnet virostatisch, jedoch können die Viren nicht eliminiert werden. (Lutz SCHNEIDER (1991) Neue Arzneistoffe, Vol 136, Nr. 46,) Eine wesentliche Problematik der Cytomegalievirus-Infektion stellt die Notwendigkeit der bisweilen lebenslangen Dauerbehandlung der Patienten dar. Nachteilig ist weiterhin, daß die Cytomegalieviren in der letzten Zeit resistenter gegen diese Substanz geworden sind. (Stanat et al. (1991) Antimicrob. Agents, Chemother. Vol 35, Nr. 11: 2191 - 2197 und Knox et al. (1991) Lancet, Vol 337: 1292 - 1293)

15

Aufgabe der Erfindung ist das Anbieten von Peptiden oder deren Derivaten, die die Sekretion von Interferon - γ aus CD8⁺ T Zellen induziert. Diese Peptide und deren Derivate sind als Mittel zur Vakzinierung geeignet. Ebenso sind sie zur Diagnostik geeignet, um Patienten identifizieren zu können, welche eine Immunantwort gegen HCMV entwickeln können.

Die Aufgabe wird gelöst durch Peptide, die gegebenenfalls Fragmente des IE-1 Proteins sind, oder Peptidderivate davon, aus der folgenden Gruppe mit der Sequenz:

25 R_N - Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile- R_C

R_N - IE-1₀₃₇₋₀₅₁- R_C

R_N - IE-1₀₇₃₋₀₈₇- R_C

R_N - IE-1₀₈₅₋₀₉₉ - R_C

R_N - IE-1₁₈₁₋₁₉₅- R_C

30 R_N - IE-1₁₉₃₋₂₀₇ - R_C =

R_N - Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met- R_C

R_N - IE-1₁₉₈₋₂₀₇ - R_C = R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met- R_C

R_N - IE-1₁₉₉₋₂₁₃ - R_C =

R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu- R_C

35 R_N - IE-1₂₈₉₋₃₀₃- R_C

R_N - IE-1₃₀₇₋₃₂₁ - R_C =

R_N - Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr Ser- R_C

R_N - IE-1₃₇₉₋₃₉₃ - R_C

R_N - IE-1₄₂₁₋₄₃₅ - R_C

dabei steht

R_N für -H oder eine Amino - Schutzgruppe oder mindestens eine weitere Aminosäure außerhalb des Peptids oder Peptidderivates,

R_C für -OH oder eine Carboxyl-Schutzgruppe oder mindestens eine weitere Aminosäure außerhalb des Peptids oder Peptidderivates,

IE-1_{nnn-nnn} für eine Sequenzfolge aus dem Protein Immediate - Early 1 Protein (IE-1), dabei entspricht die Zahl nnn bis nnn den Aminosäuren in den Positionen des IE-1,

wobei die Peptid -Derivate eine Deletion, Insertion oder Substituierung von ein, zwei oder drei Aminosäuren der zuvor genannten Sequenzen aufweisen,

wobei die Peptidderivate im wesentlichen die Funktion des Peptids

Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile

besitzt, in CD8⁺ T Zelle die Sekretion von Interferon - γ zu induzieren.

Die Sequenz von IE-1 (immediate - early 1 protein) ist beschrieben und definiert in N.J. ALP et al. (1991) Fine specificity of cellular immune responses in humans to human cytomegalovirus immediate - early 1 protein, J. Virol., Vol: 65, pp 4812 - 4820.

Die Aufgabe wird weiterhin gelöst durch Peptide oder Peptidderivate davon, aus der folgenden Gruppe mit der Sequenz:

R_N - Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu - R_C

R_N - Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu - R_C

R_N - Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu - R_C

R_N - Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C

R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu - R_C

R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C

R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr - R_C

R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C

dabei steht

R_N für -H oder eine Amino - Schutzgruppe oder mindestens eine weitere Aminosäure außerhalb des Peptids oder Peptidderivates,

R_C für -OH oder eine Carboxyl-Schutzgruppe oder mindestens eine weitere Aminosäure außerhalb des Peptids oder Peptidderivates,

wobei die Peptid -Derivate eine Deletion, Insertion oder Substituierung von ein, zwei oder drei Aminosäuren der zuvor genannten Sequenzen aufweisen,

wobei die Peptidderivate im wesentlichen die Funktion des Peptids

Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu
besitzt, in CD8⁺ T Zelle die Sekretion von Interferon – γ zu induzieren.

5 Die einzelnen Aminosäuren haben in den jeweiligen Positionen unterschiedliche Bevorzugung.

Der Vergleich der verschiedenen Aminosäuren erfolgt durch Austausch einer Aminosäure in einer definierten Position bei gleichzeitiger Beibehaltung der anderen Aminosäuren in den restlichen Positionen. Generell sind auch mehrfache Substituierungen möglich.

10

Die Funktionen der Peptide oder Peptidderivate werden wesentlich verändert, wenn Substituenten gewählt werden, die bei der Substituierung weniger konservativ als die im folgenden erwähnten Aminosäuren sind. So sind die

15

Substituenten Gly und Ser der Aminosäure Ala ähnlich, weiterhin ist der Substituent Lys der Aminosäure Arg ähnlich. Die Substituenten Gln und His sind der Aminosäure Asn ähnlich, der Substituent Glu ist der Aminosäure Asp ähnlich, der Substituent Ser ist der Aminosäure Cys ähnlich, der Substituent Asn ist der Aminosäure Gln ähnlich, der Substituent Asp ist der Aminosäure Glu ähnlich, der Substituent Thr ist der Aminosäure Ser ähnlich, der Substituent Ser

20

ist der Aminosäure Thr ähnlich, der Substituent Tyr ist der Aminosäure Trp ähnlich, die Substituenten Ala und Pro sind der Aminosäure Gly ähnlich, die Substituenten Asn und Gln sind der Aminosäure His ähnlich, die Substituenten Leu und Val sind der Aminosäure Ile ähnlich, die Substituenten Ile und Val sind der Aminosäure Leu ähnlich, die Substituenten Arg, Gln und Glu sind der Aminosäure Lys ähnlich, die Substituenten Leu, Tyr und Ile sind der Aminosäure Met ähnlich, die Substituenten Met, Leu und Tyr sind der Aminosäure Phe ähnlich, die Substituenten Trp und Phe sind der Aminosäure Tyr ähnlich, und die Substituenten Ile und Leu sind der Aminosäure Val ähnlich.

25

Derartige wesentlichen Veränderungen lassen sich durch Substituierungen mit Aminosäuren erzielen, die sich mehr in ihrer Struktur und in den funktionellen Gruppen unterscheiden. Wesentliche Veränderungen wirken sich dahingehend aus, daß die dreidimensionale Struktur deutlich verändert wird und/oder daß zum Beispiel die Faltblatt-Struktur oder die helikale Struktur beeinflußt wird.

30

Auch Wechselwirkungen der Ladungen und der hydrophoben Ketten sind bei den Veränderungen zu beachten.

Derartige Analysen über Substituierungen lassen sich leicht bewerkstelligen. Dabei wird je eine Aminosäure in einer Position gegen bevorzugt Alanin oder eine weitere Aminosäure ausgetauscht. Nach der Synthese des modifizierten Proteins wird die Funktion des veränderten Peptids gemessen, indem die Funktion des Peptids gemessen wird. Die Funktionen und deren Messung sind in den Beispielen dargestellt. Auch mehrfache Substituierungen sind möglich.

Definitionen

Die im Text verwendeten **Abkürzungen** sind durch die Regeln bestimmt, die von der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur festgelegt worden sind (Biochemistry 11: 1726 (1972) und Biochem. J. 219: 345 (1984)). Folgende übliche Abkürzungen werden verwendet: Ala = A = Alanin; Arg = R = Arginin; Asn = N = Asparagin; Asp = D = Asparaginsäure; Cys = C = Cystein; Gln = Q = Glutamin; Glu = E = Glutaminsäure; Gly = G = Glycin; His = H = Histidin; Ile = I = Isoleucin; Leu = L = Leucin; Lys = K = Lysin; Met = M = Methionin; Phe = F = Phenylalanin; Pro = P = Prolin; Ser = S = Serin; Thr = T = Threonin; Trp = W = Tryptophan; Tyr = Y = Tyrosin und Val = V = Valin.

Die **Schutzgruppe** des Restes R_N kann bestehen aus:

Alkyl-, Aryl-, Alkylaryl-, Aralkyl-, Alkylcarbonyl- oder Arylcarbonylgruppen mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, bevorzugt sind Naphthoyl-, Naphthylacetyl-, Naphthylpropionyl-, Benzoylgruppe oder einer Acylgruppe mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen.

Die **Schutzgruppe** des Restes R_C kann bestehen aus:

Eine Alkoxy- oder Aryloxygruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder aus einer Aminogruppe.

Weitere **Schutzgruppen** - sowohl für R_N und R_C - sind in Houben-Weyl (1974) Georg Thieme Verlag, 4. Auflage beschrieben. Die Beschreibung der Schutzgruppen in der zitierten Literaturangabe ist Teil der Offenbarung.

Die Sequenz der erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate kann am N-terminalen und/oder C-terminalen Ende an Stelle einer Schutzgruppe mit weiteren

Rahmen-Aminosäure-Sequenzen verbunden sein. Diese weiteren Rahmen-Aminosäure-Sequenzen sind für die Funktion der erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate nicht wesentlich, sie können jedoch Träger von anderen Funktionen sein, so zum Beispiel enzymatische Funktionen umfassen. Derartige Rahmen - Aminosäure - Sequenzen treten in der Natur auf. Es kann sich dabei zum Beispiel um die zwischen den hypervariablen Bereichen angeordneten Sequenzen des variablen Bereichs eines Antikörpers handeln. Diese Sequenzen werden als "Frame-Work" (Rahmensequenzen) bezeichnet. Als Rahmen - Aminosäure - Sequenzen sind weiterhin nicht abgespaltene Signalsequenzen eines sezernierten eukaryontischen Proteins bekannt, wobei das Protein in einem Bakterium exprimiert wird. Derartige Signalsequenzen haben bisweilen keinen Einfluß auf die Funktion des nachfolgenden Proteins. Ebenfalls ist es möglich, erfindungsgemäße Peptide oder Peptidderivate hintereinander zu koppeln, wobei Rahmen - Aminosäure - Sequenzen zwischen den Einzelsequenzen angeordnet sind. Ebenfalls sind Fusionsproteine bekannt, bei denen am N-terminalen oder am C-terminalen Ende das Peptid peptidisch gebunden ist. Ein solches Fusionsprotein ist von Bakterien oder eukaryontischen Zellen exprimierbar.

Um im Einzelfall zu entscheiden, ob ein bestimmtes erfindungsgemäßes Peptid oder Peptidderivat mit wenigstens einer Rahmen - Aminosäure - Sequenz und / oder wenigstens einer Schutzgruppe zum Gegenstand der Erfindung zählt, ist ein Vergleich zwischen

- (i) diesem Peptide oder Peptidderivat **mit** Rahmen-Aminosäure-Sequenz und / oder **mit** Schutzgruppe und
 - (ii) demselben Peptid oder Peptidderivat **ohne** Rahmen-Aminosäure-Sequenz und **ohne** Schutzgruppe
- anzustellen. Dabei sollten beide Moleküle im wesentlichen dieselben Funktion des Peptids besitzen, in CD8⁺ T Zelle die Sekretion von Interferon - γ zu induzieren.

Die aufgeführten **Aminosäuren** sind natürliche oder künstliche Aminosäuren. Die künstlichen Aminosäuren sind in Houben-Weyl (1974) Georg Thieme Verlag, 4. Auflage beschrieben. Dabei ist der Austausch einer beschriebenen Aminosäure durch eine weitere Aminosäure, die zur Gruppe der natürlichen oder künstlichen Aminosäuren gehört, leicht möglich und aufgrund des Testsystems und Vergleichs mit

Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile

leicht möglich, herauszufinden, ob eine Wirkung vorliegt, die gleiche oder ähnliche den gefundenen erfindungsgemäßen Substanzen ist. Unter den Schutzzumfang fallen auch alle D-Aminosäuren und alle Aminosäuren, die künstlich herstellbar sind. (Houben-

Weyl). Für den Fachmann ist es ein leichtes, unter Beibehaltung der Funktionen, die im Test überprüfbar sind, die molekulare Struktur unter Beibehaltung der wesentlichen Bausteine abzuwandeln. Auch diese funktionell gleichwirkenden Moleküle fallen unter den Begriff der Peptidderivate.

5

Vorteile

Die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate ermöglichen es, gezielt Vakzine gegen eine Infektion mit humanen Cytomegalievirus herzustellen. Auch können die Peptide und Peptidderivate als Diagnostika verwendet werden, um zu sehen, ob die zu untersuchenden Patienten CD8⁺ T Zellen besitzen, die durch die erfindungsgemäßen Substanzen zur Sekretion von Interleukin - γ induziert werden.

10

Bevorzugte Ausführungsformen

15

Bevorzugt sind Nonamere, die darin bestehen, daß eine längere Sequenz, wie sie zuvor ausdrücklich genannt worden ist oder deren Derivate bis auf neun zusammenhängende Aminosäuren gekürzt werden. Dabei kann die Deletion N - terminal und / oder C - terminal sein. Wesentlich ist dabei das die Funktion von

20

Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile

im wesentlich dabei erfüllt wird. Daß Nonamere sehr potente Immunogene sind, ist dadurch bedingt, das MHC - Klasse I präsentierte Peptide typischer Weise eine Länge von neun Aminosäuren aufweisen. (K.O. FALK et al. (1991) Allele - specific motifs revealed by sequencing of self - peptides eluted from MHC molecules, Nature, Vol.: 351, pp 290 - 296 und H.G. RAMMENSEE et al. (1999) An Internet Database for MHC Ligands and Peptide Motifs, <http://134.296.221/scripts/hlaserver.dll/home.htm>)

25

Ebenso ist es möglich, die zuvor genannten Nonamere mit weiteren Aminosäuren peptidisch zu verbinden, so daß Sequenzen von mindestens 10 Aminosäuren entstehen. Diese Sequenzen haben ebenfalls die Funktion, in CD8⁺ T Zelle die Sekretion von Interferon - γ zu induzieren. Somit zählen zum Schutzzumfang der Erfindung auch die um mindestens eine Aminosäure verlängerte Sequenz eines Nonamers, das die Funktion aufweist, in CD8⁺ T Zelle die Sekretion von Interferon - γ zu induzieren. Für die verlängerten Nonamere ist wesentlich, daß sie ebenfalls die Funktion besitzen, in CD8⁺ T Zelle die Sekretion von Interferon - γ zu induzieren.

30

35

Herstellung der Peptide

Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate leicht herstellbar. Derart kurze Peptide oder Peptidderivate können mittels einer Technik hergestellt werden, die den Fachleuten im Bereich der Peptidsynthese bekannt ist. Eine Zusammenfassung vieler dieser Techniken können bei J.M. STEWART and J.D. YOUNG, San Francisco, 1969; und J. MEIERRHOFER, Hormonal Proteins and Peptides, Vol. 2 p 46, Academic Press (New York), 1973 für die Festphasen-Methode und E. SCHRODER and K.LUBKE, The Peptides, Vol. 1, Academic Press (New York) 1965 für die Flüssigphasen-Methode nachgelesen werden. Die Schritte der Synthese sind in den EP-A 0 097 031 beschrieben. Die allgemeinen Verfahrensschritte aus den europäischen Publikationen lassen sich analog auf die Synthese der hier beschriebenen erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate übertragen. Weitere Literatur zu der Festphasensynthese sind: Solid Phase Synthesis, E. ATHERTON and R.C. SHEPPARD (1989) IRL Press, ISBN 1-85221-133-4 and Amino Acid and Peptide Synthesis, J. JONES, Oxford Science Publication (1992) ISBN 0-19-855668-3.

Weitere Ausführungsformen bezüglich der Reste

Neben der Abwandlung der Aminosäure-Sequenz der erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate ist auch eine Variation der Reste R_N und R_C möglich. Die Reste brauchen jedoch die Funktion nicht zu beeinflussen. Dennoch lassen sich durch Schutzgruppen Parameter wie Stabilität, pH-Abhängigkeit, biologische Abbaubarkeit und Interaktionen mit dem nativen Teil des Fusionsproteins deutlich beeinflussen.

Bevorzugt sind erfindungsgemäße Peptide oder Peptidderivate, bei denen der Rest R_N für -H oder eine Amino-Schutzgruppe und R_C für -OH oder eine Carboxyl-Schutzgruppe steht.

Bevorzugter sind erfindungsgemäße Peptide oder Peptidderivate, bei denen die Reste stehen:

R_N für -H oder eine Acylgruppe
und
 R_C für -OH oder Amino-Gruppe.

Am meisten bevorzugt sind erfindungsgemäße Peptide oder Peptidderivate, bei denen die Reste stehen:

R_N für -H
und
 R_C für -OH.

Herstellungsverfahren der erfindungsgemäßen Peptide

Die Erfindung umfaßt weiterhin die Herstellung der erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate, wobei eine N- α geschützte ω -Amino- α -aminosäure mit einem Dialdehyd in Gegenwart eines Reduktionsmittels umgesetzt und anschließend die Schutzgruppen der Seitenketten und gegebenenfalls die Schutzgruppen des N-Terminus und/oder des C-Terminus abgespalten werden.

Ebenfalls umfaßt die Erfindung ein Verfahren, bei dem die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate hergestellt werden, indem die Aminosäuren in einer homogenen Phase oder nach der Festphasen - Methode kondensiert werden, wobei das Carboxyl - Ende einer zu koppelnden Aminosäure, deren Aminogruppen und gegebenenfalls funktionellen Gruppen der Seitenkette eine Schutzgruppe tragen, mit dem freien Amino - Ende der zu koppelnden Aminosäure oder des zu koppelnden Peptids in Gegenwart eines Kondensationsreagenzes reagiert, und

im Falle einer nicht-endständigen Aminosäure anschließend die α -Amino-Schutzgruppe der gekoppelten Aminosäure abgespalten wird und weitere Aminosäuren an die zu synthetisierende Peptid-Kette nach den zuvor beschriebenen beiden Schritten gekoppelt werden

oder

im Falle einer endständigen Aminosäure gegebenenfalls anschließend die α -Amino-Schutzgruppe der gekoppelten Aminosäure abgespalten wird

und

nach Kopplung der letzten Aminosäure im Falle der Festphasen-Methode das Peptid oder Peptidderivat von der Festphase abgespalten wird.

30

Verwendung als Medikament

Die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate sind geeignet als Medikament oder Diagnostikum eingesetzt zu werden.

Am meisten bevorzugt ist die Verwendung eines Peptids oder Peptidderivates zur Herstellung eines Medikaments zur Vakzinierung gegen eine Infektion des humanen Cytomegalieviruses.

Ebenfalls ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Peptids oder Peptidderivates zur Herstellung eines Diagnostikums zur Identifizierung von einer anti – HCMV Antwort in einem Patienten vorteilhaft. Bei der Diagnose wird dem Patienten Blut entnommen und dabei mit Hilfe von den erfindungsgemäßen Peptiden und Peptidderivaten die Interleukin – γ Produktion in CD8⁺ T Zellen induziert.

Als Medikament sind die Peptide oder Peptidderivate bevorzugt, wenn sie eine Zusammensetzung mit pharmakologisch verträglichen Hilfs- und Trägerstoffen bilden. Derartige Hilfs- und Trägerstoffe sind in Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed. Mack Publishing Company, East Pennsylvania (1980) beschrieben. Die Zusammensetzungen können nach bekannten Verfahren hergestellt werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate besitzen pharmakologische Eigenschaften und sind deshalb als pharmazeutischer Wirkstoffe, insbesondere als Vakzin oder Diagnostikum verwendbar. Die Erfindung umfaßt ebenfalls ein Arzneimittel, das die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate enthält.

Die Versuchsergebnisse dieses *in vitro* Tests zeigen, daß die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate als Arzneimittel oder zur medizinischen Behandlung verwendet werden können. Diese Versuchsergebnisse lassen sich von dem *in vitro* Testsystem auf ein *in vivo* System problemlos übertragen.

Bevorzugt ist das folgende Peptid:

Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile

Die Erfindung liefert weiterhin

- (i) die Verwendung von erfindungsgemäßen Peptiden oder Peptidderivaten (zur Herstellung eines Medikaments) als Vakzin gegen Infektionen des HCMV;
- (ii) eine pharmakologische Zusammensetzung als Vakzin gegen Infektionen des HCMV, welche Behandlung die erfindungsgemäße Peptide oder Peptidderivate und wenigstens einen pharmazeutischen Hilfs- und / oder Trägerstoff umfaßt.

Für die therapeutische Wirkung sind unterschiedliche Dosen geeignet. Sie hängen beispielsweise von den verwendeten Salzen, vom Wirt, von der Art der Verabreichung und von der Art und der Schwere der zu behandelnden Zustände ab.

Auch sind Kombinationen der erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate möglich.

Beispiele

Methoden

Mit Zitrat versetztes Blut wurde von HCMV positiven Blutspendern erhalten, die einen definierten HLA – Typ besitzen. Es folgt eine Ficoll – Paque Dichte Zentrifugation. Die Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen. Sie wurden in RPMI 1640 resuspendiert, welches 0,1 % BSA und 50 mM Glutamin enthält. Die Zellen werden auf 10^7 Zelle pro ml eingestellt. 200 µl der Zell - Suspension und die Peptid - Lösung (10µm pro ml in RPMI / BSA) werden in Cellstar^R Polystyren – Röhrchen gefüllt und in einem Inkubator gelagert.

Nach einer Stunde wurden 1600 µl RPMI 1640 hinzugegeben, welches 12,5% FCS, 50 mM Glutamin und 12,5 µg pro ml Brefeldin A enthält. Nach fünf weiteren Stunden wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, resuspendiert in PBS mit 1 mM EDTA, inkubiert für 10 weitere Minuten bei 37 °C und erneut mit kaltem PBS gewaschen.

Nach einer Oberflächenmarkierung mit monoklonalen Antikörper über 30 Minuten bei 4°C im dunkeln wurden die Zellen in PBS, das 4 % Paraformaldehyd enthält, über 4 Minuten bei 37 °C fixiert und in PBS gemäß der Versuchsanordnung für die Permeation – Lösung von Becton Dickinson gewaschen.

Für die folgende intrazelluläre Markierung wurden die Zellen in PBS gewaschen und in einem FACScalibur^R Durchfluß – Zytometer (Becton Dickinson) unter Verwendung einer CellQuestTM Software analysiert. Nicht stimulierte Proben wurden als Kontrolle eingesetzt.

Ergebnisse:

Die erfindungsgemäßen Substanzen zeigten eine Stimulierung der CD8⁺ T Zellen. Diese Substanzen sind daher als Vakzine geeignet. Weiterhin sind sie geeignet, als Diagnostikum eingesetzt zu werden, wobei die Zellen identifiziert werden, die auf HCMV reagieren können. Die Unfähigkeit oder Fähigkeit eines Patienten, auf HCMV reagieren zu können oder bereits mit ihm in Kontakt gekommen zu sein, wird durch diese Form der Diagnostik festgestellt.

Herstellung der Peptide

Die Synthese von Peptiden oder Peptidderivaten ist an einem Multiplen Peptidsynthesizer (MPS) AMS 422 von ABIMED (Langenfeld) ausführbar (H. GAUSEPOHL et al. (1992) Peptide Research 5/6: 315 - 320).

Für die Peptidsynthese werden als feste Träger gehärtete Zellulose (Whatman 540; Katalog Nummer 1540917) der Firma Whatman (Maidstone, Großbritannien) und Polystyrolharz Tenta Gel SRAM (Kapazität 0,25 meq/g) der Firma Rapp Polymere (Tübingen, Deutschland) benutzt.

Ausführlich ist die Festphasen Peptidsynthese beschrieben in Rudolf Volkmer- Engert, Berit Hoffmann and Jens Schneider-Mergener, (1997) Stable Attachment of the HMB-Linker to Continuous Cellulose Membranes for Parallel Solid Phase Spot Syntheses, Tetrahedron Letter, Vol. 38,6; pp 1029 - 1032.

Sequenzprotokoll:

(1) ALLGEMEINE ANGABEN

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Florian KERN
5 (B) STRASSE: Wolliner Straße 9
(C) ORT: 10435 BERLIN
(E) LAND: DEUTSCHLAND
(F) POSTLEITZAHL: 10435

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

10

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 11 Sequenzprotokolle

(iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG

(A) DATENTRÄGER: DISKETTE
(B) COMPUTER: 486/INTEL
15 (C) BETRIEBSSYSTEM: WINDOWS
(D) SOFTWARE: WINWORD;
(v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

20 (2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren
ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz
MERKMAL: Vakzin gegen HCMV

25 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 1:
Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

30 SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren
ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz
MERKMAL: Vakzin gegen HCMV, Sequenz aus dem IE-1 mit
den Positionen IE-1 193-207

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 2:

Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

35

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 10 Aminosäuren
ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz
40 MERKMAL: Vakzin gegen HCMV, Sequenz aus dem IE-1 mit
den Positionen IE-1 198-207

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 3:

Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

45

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE:

15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ:

Aminosäure-Sequenz

5 MERKMAL:

Vakzin gegen HCMV, Sequenz aus dem IE-1 mit
den Positionen IE-1 199-213

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 4:

Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu

10 (2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE:

15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ:

Aminosäure-Sequenz

MERKMAL:

Vakzin gegen HCMV, Sequenz aus dem IE-1 mit
den Positionen IE-1 307-321

15

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 5:

Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr Ser

20 (2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE:

9 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ:

Aminosäure-Sequenz

MERKMAL:

Vakzin gegen HCMV,

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 6:

25

Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE:

9 Aminosäuren

30 ART DER SEQUENZ:

Aminosäure-Sequenz

MERKMAL:

Vakzin gegen HCMV,

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 7:

Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu

35 (2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE:

9 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ:

Aminosäure-Sequenz

MERKMAL:

Vakzin gegen HCMV,

40 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 9:

Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

45 SEQUENZLÄNGE:

9 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ:

Aminosäure-Sequenz

MERKMAL:

Vakzin gegen HCMV,

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 10:

Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE:

9 Aminosäuren

5 ART DER SEQUENZ:

Aminosäure-Sequenz

MERKMAL:

Vakzin gegen HCMV,

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 11:

Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr

Patentansprüche:

Peptide, die gegebenenfalls Fragmente des IE-1 Proteins sind, oder Peptidderivate
 5 davon, aus der folgenden Gruppe mit der Sequenz:

R_N - Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile- R_C

R_N - IE-1₀₃₇₋₀₅₁- R_C

R_N - IE-1₀₇₃₋₀₈₇- R_C

R_N - IE-1₀₈₅₋₀₉₉ - R_C

10 R_N - IE-1₁₈₁₋₁₉₅- R_C

R_N - IE-1₁₉₃₋₂₀₇ - R_C =

R_N - Ala Lys Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met- R_C

R_N - IE-1₁₉₈₋₂₀₇ - R_C = R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met- R_C

R_N - IE-1₁₉₉₋₂₁₃ - R_C =

15 R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu- R_C

R_N - IE-1₂₈₉₋₃₀₃- R_C

R_N - IE-1₃₀₇₋₃₂₁ - R_C =

R_N - Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr Ser- R_C

R_N - IE-1₃₇₉₋₃₉₃- R_C

20 R_N - IE-1₄₂₁₋₄₃₅- R_C

dabei steht

R_N für -H oder eine Amino - Schutzgruppe oder mindestens eine weitere
 Aminosäure außerhalb des Peptids oder Petidderivate,

R_C für -OH oder eine Carboxyl-Schutzgruppe oder mindestens eine weitere
 25 Aminosäure außerhalb des Peptids oder Petidderivate,

IE-1_{nnn-nnn} für eine Sequenzfolge aus dem Protein Immediate - Early 1 Protein
 (IE-1), dabei entspricht die Zahl nnn bis nnn den Aminosäuren in den Positionen
 des IE-1,

wobei die Peptidderivate eine Deletion, Insertion oder Substituierung von ein, zwei oder
 30 drei Aminosäuren der zuvor genannten Sequenzen aufweisen,

wobei die Peptidderivate im wesentlichen die Funktion des Peptids

Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile

besitzt, in CD8⁺ T Zelle die Sekretion von Interferon - γ zu induzieren.

35 2. Peptide oder Peptidderivate davon, aus der folgenden Gruppe mit der Sequenz:

R_N - Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu - R_C

R_N - Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu - R_C

R_N - Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu - R_C

R_N - Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met- R_C

R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu- R_C

R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met- R_C

R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr - R_C

5 R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C

dabei steht

R_N für -H oder eine Amino - Schutzgruppe oder mindestens eine weitere Aminosäure außerhalb des Peptids oder Peptidderivates,

10 R_C für -OH oder eine Carboxyl-Schutzgruppe oder mindestens eine weitere Aminosäure außerhalb des Peptids oder Peptidderivates,

wobei die Peptid -Derivate eine Deletion, Insertion oder Substituierung von ein, zwei oder drei Aminosäuren der zuvor genannten Sequenzen aufweisen,

wobei die Peptidderivate im wesentlichen die Funktion des Peptids

Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu

15 besitzt, in CD8⁺ T Zelle die Sekretion von Interferon - γ zu induzieren.

3. Fragmente von Peptiden oder Peptidderivaten nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Fragmente Nonamere sind, die darin bestehen, daß eine längere Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 bis auf neun zusammenhängende Aminosäuren gekürzt wird, wobei

20 die Deletion N - terminal und / oder C - terminal ist und wobei die Funktion von

Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile

im wesentlich von dem Nonamer dabei erfüllt wird.

4. Peptide oder Peptidderivate nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei

25 R_{N11} für -H oder eine Amino-Schutzgruppe

und

R_{C11} für -OH oder eine Carboxyl-Schutzgruppe steht.

5. Peptide oder Peptidderivate nach Anspruch 4, wobei die Reste stehen:

30 R_{N11} für -H oder eine Acylgruppe

und

R_{C11} für -OH oder Amino-Gruppe.

6. Peptide oder Peptidderivate nach Anspruch 5, wobei die Reste stehen:

35 R_{N11} für -H

und

R_{C11} für -OH.

7. Peptide oder Peptidderivate nach einem der vorherigen Ansprüche als Medikament oder Diagnostikum.
8. Verwendung eines Peptides oder Peptidderivates nach einem der vorherigen Ansprüche zur Herstellung eines Medikaments zur Vakzinierung gegen HCMV Infektionen.
9. Verwendung eines Peptides oder Peptidderivates nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung eines Diagnostikums zur Identifizierung von einer HCMV - Infektion.

Zusammenfassung:

Peptide, die gegebenenfalls Fragmente des IE-1 Proteins sind, aus der folgenden Gruppe mit der Sequenz:

R_N - Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile- R_C

5 R_N - IE-1₀₃₇₋₀₅₁- R_C

R_N - IE-1₀₇₃₋₀₈₇- R_C

R_N - IE-1₀₈₅₋₀₉₉- R_C

R_N - IE-1₁₈₁₋₁₉₅- R_C

R_N - IE-1₁₉₃₋₂₀₇- R_C =

10 R_N - Ala Lys Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met- R_C

R_N - IE-1₁₉₈₋₂₀₇- R_C = R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met- R_C

R_N - IE-1₁₉₉₋₂₁₃- R_C =

R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu- R_C

R_N - IE-1₂₈₉₋₃₀₃- R_C

15 R_N - IE-1₃₀₇₋₃₂₁- R_C =

R_N - Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr Ser- R_C

R_N - IE-1₃₇₉₋₃₉₃- R_C

R_N - IE-1₄₂₁₋₄₃₅- R_C

dabei steht

20 R_N für -H oder eine Amino - Schutzgruppe

R_C für -OH oder eine Carboxyl-Schutzgruppe

Die erfindungsgemäßen Peptide werden zur Herstellung eines Medikaments zur Vakzinierung gegen HVMV - Infektionen oder Diagnostikums zur Identifizierung von einer HCMV - Infektion verwendet.



10-10-1980